

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年12月7日 (07.12.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/129755 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/22 (2006.01) *A61K 35/28 (2006.01)*
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 9/10 (2006.01)*

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/310989

(22) 国際出願日: 2006年6月1日 (01.06.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-161005 2005年6月1日 (01.06.2005) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社新潟ティーエルオー (NIIGATA TLO CORPORATION) [JP/JP]; 〒9502102 新潟県新潟市五十嵐2の町8050番地 Niigata (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 烏羽 健 (TOBA, Ken) [JP/JP]; 〒9518113 新潟県新潟市寄居町700-1-603 Niigata (JP). 加藤 公則 (KATO, Kiminori) [JP/JP]; 〒9500861 新潟県新潟市中山3丁目8番15号 Niigata (JP). 樋口 正人 (HIGUCHI, Masato) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 杜本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

WO 2006/129755 A1

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR BLOOD-RELATED DISEASE CONTAINING EPO DERIVATIVE

(54) 発明の名称: EPO誘導体含有血液関連疾患治療剤

(57) Abstract: A blood flow increasing agent, a vascular promoter or a therapeutic agent for an ischemic disease containing an erythropoietin (EPO) derivative as an active ingredient.

(57) 要約: エリスロポエチン (EPO) 誘導体を有効成分とする血流増加剤、血管促進剤又は虚血性疾患治療剤。

明 細 書

EPO誘導体含有血液関連疾患治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、EPO誘導体を有効成分とする血流増加剤、血管促進剤又は虚血性疾患の治療剤に関する。

背景技術

[0002] エリスロポエチン(以下においてEPOと記載することもある)は、赤血球系前駆細胞の分化、増殖を促進する酸性糖タンパク質ホルモンであり、主として腎臓から產生される。血液中に最も豊富に存在する赤血球は、一定期間機能した後に脾臓などで破壊される(ヒトでは平均寿命が約120日)が、骨髄から絶えず供給されることによって、正常な状態では末梢の全赤血球数は常に一定に保たれている。EPOはこのような生体の赤血球の恒常性維持において中心的な役割を担っている。臨床的にはEPOは貧血の治療や術前術後の管理に利用されている。

[0003] また、EPOが血管新生促進作用を有し、虚血性疾患の治療剤として有用であることも報告されている(Anatole B et al., The New England Journal of Medicine, 339(9),584-590, (1998)、Christopher H et al., Blood, 102(4),1340-1346,(2003)、Ferdinand H B et al.,Blood,103(3),921-926, (2004)、Kyle J S et al.,Cardiovascular Research,(59), 538-548,(2003)、Ferdinand H B et al.,Kidney International,64,1648-1652,(2003))。しかし、血管新生作用の目的でEPOを投与する場合、本来の目的ではない赤血球增加を引き起こす可能性がある。従って、赤血球增加作用ができるだけ抑制され、かつ虚血性疾患などの血液関連疾患の治療剤として使用できる新規な治療剤が求められている。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、虚血性疾患などの治療剤として使用できる治療剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、EPO誘導体、特にアシアロEPOが血流増加作用、血管促進作用又は虚血性疾患治療作用を有することを見出し、本発明を完成させた。

[0006] すなわち、本発明は、以下のものを提供する。

- (1) エリスロポエチン(EPO)誘導体を有効成分とする虚血性疾患治療剤。
- (2) EPO誘導体がアシアロEPOである(1)の治療剤。
- (3) 幹細胞含有物質とともに投与される(1)または(2)の治療剤。
- (4) 幹細胞含有物質が骨髄細胞である(3)の治療剤。
- (5) EPO誘導体を有効成分とする血管促進剤。
- (6) EPO誘導体がアシアロEPOである(5)の促進剤。
- (7) 幹細胞含有物質とともに投与される(5)または(6)の促進剤。
- (8) 幹細胞含有物質が骨髄細胞である(7)の促進剤。
- (9) EPO誘導体を有効成分とする血流増加剤。
- (10) EPO誘導体がアシアロEPOである(9)の増加剤。
- (11) 幹細胞含有物質とともに投与される(9)または(10)の増加剤。
- (12) 幹細胞含有物質が骨髄細胞である(11)の増加剤。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図1は、ICRマウスの下肢虚血モデルを用いたEPO誘導体による治療実験の結果(左図:生存効果、右図:血管再生効果)を示すグラフである。

[図2]図2は、ICRマウスの下肢虚血モデルを用いた骨髄細胞とともに投与されるEPO誘導体による治療実験の結果(左図:生存効果、右図:血管再生効果)を示すグラフである。

[図3]図3は、ICRマウスの下肢虚血モデルを用いた治療実験の結果(血流回復効果)を示すグラフである。

[図4]図4は、ICRマウスの下肢虚血モデルを用いた治療実験の結果(血管新生効果)を示すグラフである。

[図5]図5は、無処置のICRマウスを用いた、EPO及びアシアロEPOの多血症の発症に及ぼす効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0008] EPO

本発明に用いるEPOは、どのようなEPOでも用いることができるが、好ましくは高度に精製されたEPOであり、より具体的には、哺乳動物EPO、特にヒトEPOと実質的に同じ生物学的活性を有するものである。

[0009] 本発明で用いるEPOは、いかなる方法で製造されたものでもよく、例えば、ヒト由来の抽出物から精製して得られた天然のヒトEPO(特公平1-38800号公報、など)や、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、C127細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、BHK細胞、昆虫細胞、などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したヒトEPOなどを用いることができる。本発明において用いられるEPOは、遺伝子工学的手法により製造されたEPOが好ましく、哺乳動物細胞(特にCHO細胞)を用いて製造されたEPOが好ましい(例えば、特公平1-44317号公報、Kenneth Jacobs et al., *Nature*, 313 806-810 (1985)、など)。

[0010] 遺伝子組換え法により得られるEPOには、天然由来のEPOとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列中の1または複数のアミノ酸を欠失、置換、付加等したもので、天然由来のEPOと同様の生物学的活性を有するもの等であってもよい。アミノ酸の欠失、置換、付加などは当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法(Gotoh, T. et al. (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer, W. and Fritz, H.J. (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492; Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766)などを用いて、EPOのアミノ酸に適宜変異を導入することにより、EPOと機能的に同等なポリペプチドを調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。一般的に、置換されるアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に置換されることが好ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有す

るアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662–5666; Zoller, M.J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487–6500; Wang, A. et al., Science 224, 1431–1433; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409–6413)。

[0011] 又、EPOと他のタンパク質との融合タンパク質を用いることも可能である。融合ポリペプチドを作製するには、例えば、EPOをコードするDNAと他のタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよい。本発明のEPOとの融合に付される他のタンパク質としては、特に限定されない。

[0012] 又、化学修飾したEPOを用いることも可能である。化学修飾したEPOの例としては、例えば、ポリエチレングリコール・ビタミンB12等、無機あるいは有機化合物等の化合物を結合させたEPOなどを挙げることができる。

EPO誘導体

本発明においてEPO誘導体とは、EPO分子中のアミノ酸を修飾したEPO又はEPO分子中の糖鎖を修飾したEPOのことをいう。

[0013] EPO分子中の糖鎖の修飾としては、糖鎖の付加、置換、欠失などが含まれる。本発明において好ましい糖鎖の修飾としては、EPO分子中のシアル酸の欠失を挙げることができる。

[0014] 通常、組換え動物細胞により生産したEPO、尿由来のEPOのいずれにおいても、糖鎖構造の異なる多様なEPOを含むEPO組成物として得られる。EPO組成物中のEPO分子に付加しているシアル酸の数は、個々のEPO分子によって異なるが、通常、1つのEPO分子に11個～15個のシアル酸が付加している。これらのシアル酸を除去する

ことによりアシアロ化されたEPO(アシアロEPO)を作製することが可能である。アシアロ化の際に除去されるシアル酸の数は特に限定されず、全てのシアル酸を除去してもよいし、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14個のシアル酸を除去してもよい。本発明において好ましいアシアロEPOは、EPO分子に付加しているシアル酸の数が10個以下であり、さらに好ましくは5個以下であり、特に好ましくは2個以下である。なお、本発明において用いられるシアル酸の数は、EPO組成物に含まれているEPO分子の平均数を用いる。1分子あたりのシアル酸の平均は当業者に公知の方法によって測定することが可能である(EP0428267公報、など)。

[0015] シアル酸が除去されたEPO(アシアロEPO)は当業者に公知の方法で作製することができ、例えば、シリダーゼなどの酵素でEPOを処理すること等により作製することができる。シリダーゼは市販されているものを用いることが可能である。(特表2 005-507426号、Nobuo Imai et al., Eur.J.Biochem, 194, 457-462 (1990)、など)

EPO分子中のアミノ酸の修飾としては、カルバミル化、ビオチン化、アミジン化、アセチル化、グアニジン化、などを挙げることができるが、本発明において好ましいアミノ酸の修飾はカルバミル化である。

[0016] 修飾されるアミノ酸残基は特に限定されず、例えば、リジン、アルギニン、グルタミン酸、トリプトファンなどを挙げることができるが、本発明において修飾される好ましいアミノ酸はリジンである。

[0017] 従って、本発明においてアミノ酸が修飾されたEPOの特に好ましい態様として、リジンがカルバミル化されたEPOを挙げることができる(Marcel L et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science, 2004; 305: 239、Fiordaliso E et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. PNAS, 2005; 102: 2046、など)。EPOのカルバミル化には、シアナートイオン等との反応によるカルバミル化、アルキルーアソシアナート等との反応によるアルキルーカルバミル化、アリールーインシアナート等との反応によるアリールーカルバミル化などが含まれる。

疾患

本発明の治療剤は、血流増加剤、血管促進剤又は虚血性疾患治療剤として有用

である。

[0018] 本発明において血流増加とは、EPO誘導体が局所投与された部位又は該部位より末梢に位置する部位における血流量が投与前に比べて増加すること、又は虚血組織に到達する血流量が増加することを意味する。血流増加作用が得られたかどうかについては、当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、フロー技術により放射活性ミクロスファーを用いて定量することが可能である(*Am. J. Physiol.* . 243:H371-H378、(1982))。さらに、皮膚温、サーモグラフィー、レーザー血流計、下肢／上肢血圧比、組織酸素分圧などの方法により測定、確認することもできる。

[0019] 本発明において血管促進とは、血管新生の促進、血管再生の促進、又は血管の成長・発達の促進をいう。EPO誘導体により新生、再生、成長、発達などが促進される血管は特に限定されないが、動脈が好ましく、特に末梢動脈が好ましい。血管促進作用が得られたかどうかについては、当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、アルカリフォスファターゼ染色などを用いて毛細血管密度を測定すること等により可能である。さらには、血管造影などの方法で測定、確認することもできる。

[0020] 本発明の治療剤は虚血性疾患の治療に有用である。虚血性疾患は血管内腔の狭窄、血栓の生成、血管の閉塞、血管炎、血管の収縮、血液粘性の増加などの様々な要因により、血管における血流量が減少し、組織が虚血状態に陥る病状である。虚血性疾患の例としては、末梢循環障害、虚血性心疾患(虚血性心筋症、心筋梗塞症、虚血性心不全など)、虚血性腎疾患、虚血性肺疾患、感染症に関連する虚血性疾患、などがある。

[0021] 本発明の虚血性疾患治療剤が対象とする虚血性疾患は特に限定されず、如何なる虚血性疾患も対象となるが、末梢循環障害を対象とすることが好ましい。末梢循環障害は血管内腔の狭窄、血栓の生成、血管の閉塞、血管炎、血管の収縮、血液粘性の増加などにより末梢動脈の血流が減少し、末梢の組織が虚血状態に陥る病状である。末梢循環障害を伴う疾患としては、閉塞性動脈硬化症、Buerger病などの慢性動脈閉塞症、進行性全身硬化症、全身性エリテマトーデス、レイノ一病、振動病、動脈瘤、血管炎などを挙げることができる。

治療用製剤

本発明の治療剤には、必要に応じて、懸濁剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、界面活性剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を適宜添加することができる。

- [0022] 懸濁剤の例としては、メチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができる。
- [0023] 溶液補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等を挙げることができる。
- [0024] 安定化剤としては、デキストラン40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる。
- [0025] また、安定化剤としてある種のアミノ酸を添加することも可能である(例えば、特開平10-182481号公報など)。安定化剤として添加されるアミノ酸には、遊離のアミノ酸、そのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩などが含まれる。アミノ酸は1種又は2種以上を組み合わせて添加することができる。安定化剤として添加されるアミノ酸は特に限定されないが、好ましいアミノ酸としては、ロイシン、トリプトファン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、リジンを挙げることができる。
- [0026] 等張化剤としては例えば、D-マンニトール、ソルビート等を挙げることができる。
- [0027] 保存剤としては例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を挙げることができる。
- [0028] 吸着防止剤としては例えば、ヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げができる。
- [0029] 界面活性剤としては、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル;グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセ

リン脂肪酸エステル;デカグリセリルモノステアレート、デカグリセリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル;ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル;ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル;ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル;ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル;ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル;ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル;ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル;ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(ポリオキシエチレン水素ヒマシ油)等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油;ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体;ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体;ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB6~18を有するもの;陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10~18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩;ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2~4でアルキル基の炭素原子数が10~18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩;ラウリルスルホハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8~18のアルキルスルホハク酸エステル塩;天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質;スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質;炭素原子数12~18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。本発明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせて添加することができる。好まし

い界面活性剤は、ポリソルベート20, 40, 60又は80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート20及び80が特に好ましい。また、ポロキサマー(ブルロニックF-68(登録商標)など)に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

- [0030] 含硫還元剤としては例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数1~7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。
- [0031] 酸化防止剤としては例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニゾール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。
- [0032] さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩;クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてもよい。
- [0033] 本発明を徐放性製剤として行う場合、徐放性製剤は公知の方法、例えば基剤としてポリマーを用いる方法などにより調製することが可能である。基剤として用いるポリマーは生体内で分解されるポリマーを用いることが好ましい。
- [0034] 本発明の治療剤は、通常、EPO誘導体を $0.001\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ ~ $1000\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ 、好ましくは $0.01\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ ~ $100\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ 、より好ましくは $0.1\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ ~ $30\text{ }\mu\text{g/kg/day}$ の投与量で投与する。本発明の治療剤の個々の患者に対する投与量は患者の年齢、体重、症状、投与経路などを考慮して医師により決定される。
- [0035] 本発明の治療剤においては、EPO誘導体は局所投与されることが好ましい。局所投与される部位は特に限定されず、血管新生促進や血流増加を起こしたい部位(組織、器官など)や虚血状態になっている部位などに投与することができる。具体的な局所投与部位の例としては、下肢骨格筋、上肢骨格筋、心臓(心筋)などを挙げるこ

とができる。

[0036] 局所投与は、全身に大きな影響を及ぼすことなく患部局所に効率的にEPO誘導体を投与できる方法であれば特に限定されず、通常の注射器、ニードル、局所針などを用いて局所投与することが可能である。

[0037] 本発明において局所投与とは、通常、血管新生促進や血流増加を起こしたい部位や虚血状態になっている部位やその近傍などに直接EPO誘導体を投与することをいうが、血管新生促進や血流増加を起こしたい部位や虚血状態になっている部位などに直接つながっている血管に投与してもよい(例えば、肝臓が虚血部位である場合に、肝動脈にEPO誘導体を投与する場合、など)。

[0038] 本発明において治療剤は、予防を目的とした予防剤も含む。

幹細胞含有物質

本発明の治療剤は幹細胞含有物質とともに投与すると、治療効果が増強される。

[0039] 幹細胞は自己複製能と分化する能力を持った細胞であり、本発明で用いられる幹細胞は造血幹細胞でもそれ以外の幹細胞でもいずれでもよい。

[0040] 本発明において幹細胞含有物質とは、幹細胞が含まれている組成物であれば特に限定されず、幹細胞のみが含まれていてもよいし、幹細胞以外にその他の成分が含まれていてもよい。幹細胞含有物質としては、例えば、骨髓、臍帯血、末梢血などを挙げることができ、好ましい幹細胞含有物質は骨髄細胞である。

[0041] 骨髄細胞は、自家の骨髄でもよいし他家の骨髄でもよい。又、投与される骨髄の組織適合抗原(HLA又はMHC)型は必ずしも患者と一致している必要はないが、一致していることが好ましい。骨髄細胞は当業者に公知の方法により調製することが可能であり、例えば、哺乳動物を全身麻酔し、骨盤の一部(腸骨、大腿骨など)から採取することが可能である。採取された骨髄は、比重遠心法などの公知の方法により有核細胞成分あるいは低比重細胞成分を分離してもよい。

[0042] 骨髄細胞は、通常、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ 個/body、好ましくは 1×10^8 個～ 1×10^{10} 個/body、さらに好ましくは $3 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ 個/bodyが投与される。

[0043] 投与方法は特に限定されず、如何なる方法により投与されてもよいが、局所投与が好ましく、特に虚血部位に筋肉内注射することが好ましい。

[0044] 骨髓細胞の投与は複数個所または複数回に分けて投与することも可能である。例えば、四肢虚血治療の為の投与の例としては、50mlに濃縮した骨髓細胞含有溶液を50箇所(1箇所当たり1ml)に分けて筋肉内投与する方法を挙げることができ、心筋虚血治療の為の投与の例としては、10mlに濃縮した骨髓含有溶液を50箇所(1箇所当たり0.2ml)に分けて筋肉内投与する方法を挙げることができる。

[0045] 本発明はまた、EPO誘導体と幹細胞含有物質を組み合わせることを特徴とする血流増加剤、血管促進剤又は虚血性疾患治療剤を提供する。EPO誘導体と幹細胞含有物質は同時に投与しても、あるいは逐次投与してもよい。

本発明の効果

本発明者らは、後述の実施例に示したように、下肢虚血モデルを用いる治療効果実験を行ったところ、アシアロEPO単独投与はEPO単独投与に比べて、下肢の壊死をさらに強く抑制する(生存効果)が観察され、また、EPO単独投与によってチアノーゼからの回復が見られないが、アシアロEPO単独投与によってチアノーゼからの回復(実効的な血管再生効果)が観察された。さらに、骨髓細胞移植とアシアロEPO投与の併用によって、生存効果および実効的な血管再生効果が著しく助長された。

[0046] 同じく、下肢虚血モデルを用いる治療効果実験により血流回復効果を測定したところ、下肢の血流の回復に関して、アシアロEPOはEPOよりも、単独治療および骨髓細胞移植併用の両方で優れていた。

[0047] さらに、下肢虚血モデルを用いる治療効果実験により血管新生効果を測定したところ、血管の新生に関して、アシアロEPOはEPOよりも、単独治療および骨髓細胞移植併用の両方で優れていた。

[0048] また、下肢虚血を作成しない無処置のICRマウスを用いて、多血症の発症に及ぼす効果を実験したところ、EPO投与では、赤芽球造血の亢進(Ret)、脾臓での髄外造血の亢進(Sp)および多血症(Hb、Hct)が観察されたのに対し、アシアロEPOの投与によっては、このような副作用が観察されなかった。

[0049] 本発明者は、以下の理論に拘束されるものではないが、アシアロEPOはEPOに比べて血中での分解速度が速く、血中に滞留しないので、多血症のような副作用を生じないものと推測している。

[0050] 本発明に従い、EPO誘導体を投与することにより、多血症などの好ましくない作用を引き起こすことなく、血流増加、血管新生促進又は虚血性疾患の治療に使用することができる。

[0051] 本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されない。種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

[0052] なお、以下の実施例における統計的解析は、全てのデータを平均値±SDで表す。群間の比較をANOVA、次いでフィッシャーの確率検定により行った。顕著な違いをp<0.05で定義した。

実施例

[0053] 実施例1:アシアロEPOの調製

CHO細胞を用いて遺伝子組換え法で作製したEPO(中外製薬株式会社製)から、文献(Imai N. Higuchi M. Kawamura A. Tomonoh K. Oh-Eda M. Fujiwara M. Shimonaka Y. Ochi N. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. European Journal of Biochemistry. 194(2):457-62, 1990 Dec 12.)記載の方法により、アシアロEPOを調製した。シアル酸が除去されたことはSDSゲル電気泳動による分子量低下ならびに等電点電気泳動によるpI変化により確認した。また、生物活性が保持されていることはEPO依存性細胞株の増殖を指標としたバイオアッセイにより確認した。

アシアロEPOの作製

EPO凍結乾燥粉末およびノイラミニダーゼ(生化学工業)を10 mMクエン酸-リン酸緩衝液(pH 6.5)で溶解し、それぞれ1 mg/mlおよび250 mUとなるよう混和した。37°Cにて1時間インキュベートした後、C4逆相HPLCカラム(バイダック)のアセトニトリル濃度勾配溶出によってアシアロEPOを精製した。

[0054] 得られたアシアロEPOにおいてシアル酸が除去されていることは、SDSゲル電気泳動による分子量低下ならびに等電点電気泳動によるpI変化により確認した。すなわち、アシアロEPO 5.0 μgをSDS-PAGEサンプルバッファー(テフコ)中で100°C、10分間の変成処理を行い、その全量14%アクリルアミドゲル(テフコ)にて電気泳動した。ゲル

をCBB染色し、約5kDaの分子量の低下を確認した。また、PhastGel IEF 3–9(アマシヤム)にて等電点電気泳動を行った後、20% トリクロロ酢酸溶液で固定化処理し、PhastGel Protein Silver Staining Kitを用いて銀染色を行った。シアル酸の解離によってpIが8.0付近に変化していることを確認した。

アシアロEPOの生物活性

アシアロEPOが生物活性を有していることは、EPO依存性細胞株の増殖を指標としたバイオアッセイにより確認した。すなわち、EPO依存性に増殖するAS-E2細胞株(文献: Miyazaki Y, Kuriyama K, Higuchi M, Tsushima H, Sohda H, Imai N, Saito M, Kondo T, Tomonaga M: Establishment and characterization of a new erythropoietin-dependent acute myeloid leukemia cell line, AS-E2. Leukemia. 11(11):1941–9, 1997 Nov.) 10000個を0.04～10 ng/mlのアシアロEPOあるいはEPOを含む20% FCS/IMDM培地(Hyclone)中で、37°C, 5.0% CO₂条件下で3～4日間培養し、WST-1試薬(宝酒造)にて生細胞数を測定した。アシアロEPOにおいてもEPOと同様の増殖刺激が得られることが確認した。

実施例2:ICRマウスによる下肢虚血モデルの作製

チャールスリバー(Yokohama, Japan)より雄8週齢のICRマウス(30 – 35g)を購入し実験に用いた。すべての実験手順は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No.86 – 23; National Institute of Health, Bethesda, MD)に基づき無菌的に行われた。マウスをケタミン(60 mg/kg BW)およびキシラジン(6 mg/kg BW)の腹腔内投与により麻酔した。Isnerの方法に準じ左下肢の中間部に皮膚切開を加え、血管を露出した(Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM: Mouse model of angiogenesis. Am J Pathol 152: 1667 – 1679, 1998)。大腿動脈起始部を結紮のちその末梢の伏在動脈を結紮し、その他の側枝を剥離して本管とともに切除した。

[0055] なお、全てのマウスには通常の食事及び飲み水を与えた。

実施例3:下肢虚血モデルを用いる治療効果実験(生存効果および血管再生効果) (実験方法)

実施例2の方法によって作製したICRマウスの下肢虚血モデルを用いて治療実験

を行った。実験では、下肢の壊死を死と定義した(survival)。また、下肢のチアノーゼからの回復を回復と定義した(recovery)。

[0056] 実験には以下の各群を用いた(各群13匹)。

C群 : 無治療

E群:EPO(400 U/kg体重、虚血部位筋肉内注射)の6日間連日投与によって治療

AE群:同量同投与法のアシアロEPOによって治療

B群: 1×10^7 個の骨髄細胞を虚血部位筋肉内注射して治療(1日目に4箇所に分けて投与)

B+E群:B(骨髄細胞)とE(EPO)を併用

B+AE群:B(骨髄細胞)とAE(アシアロEPO)を併用

(結果)

各治療の生存効果及び回復効果に及ぼす結果を図1及び図2に示す。結果をまとめると以下の通りである。

(1) EPO単独投与は下肢の壊死を抑制するが、アシアロEPO単独投与は下肢の壊死をさらに強く抑制する(生存効果)。

(2) EPO単独投与によってはチアノーゼからの回復が見られないが、アシアロEPO単独投与によってチアノーゼからの回復が観察される(実効的な血管再生効果)。

(3) 骨髄細胞移植によって生存効果および実効的な血管再生効果が観察されるが、これにEPO投与を併用するとこれらの効果が助長され、EPOのかわりにアシアロEPO投与を併用するとこれらの効果がさらに著しく助長される。

実施例4: 下肢虚血モデルを用いる治療効果実験(血流回復効果)

実施例3の下肢生存・回復モデルと同じマウス、同じ手技によって作成したマウス下肢虚血モデルを用いて血流を測定した。

(実験方法)

下肢虚血作成の当日に治療開始した(day 1)。移植は day 1に行った。EPO等の投与はday 1 - 6の6日間行った。Day 7 にレーザー・ドップラーを用いて下肢血流の回復を測定した。

[0057] 実験には以下の各群を用いた。

C群:生理食塩液筋肉内注射6日間(n=12)

E群:EPO 400 IU/kg体重の筋肉内注射6日間(n=5)

A群:アシアロEPO 400 IU/kg体重の筋肉内注射6日間(n=10)

B群:同種同系骨髄細胞移植(1×10^7 骨髄細胞) (n=7)

BE群:BとEの併用 (n=5)

BA群:BとAの併用 (n=6)

測定は、Moor Instruments社 (Wilmington, Delaware, USA) の moorLDI laser Doppler system を用いて両下肢の血流を測定し、虚血肢の測定値を健常肢の測定値で割った値を flux ratio とした。

(結果)

得られた結果を図3に示す。下肢の血流の回復に関して、アシアロEPOはEPOよりも、単独治療および骨髄細胞移植併用の両方で優れていた。

実施例5:下肢虚血モデルを用いる治療効果実験(血管新生効果)

(実験方法)

実施例4で、Laser Doppler で血流を測定したのち、虚血下肢大腿筋を取り出して標本にし、抗CD31抗体とペルオキシダーゼ法で血管を染色した。血管数と筋纖維数を計数し、前者を後者で割った値を、筋纖維あたりの血管数とした。

(結果)

得られた結果を図4に示す。血管の新生に関して、アシアロEPOはEPOよりも、単独治療および骨髄細胞移植併用の両方で優れていた。

実施例6:多血症の発症に及ぼす効果

(実験方法)

EPOの副作用である多血症の発症を見る目的で、下肢虚血を作成しない無処置のICRマウスにEPOまたはアシアロEPOを6日間連日投与(下肢筋肉内注射)し、投与初日の10日後に採血したのち安樂死させ、脾臓の重量(Sp)を測定した。また、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Hct)及び網赤血球比率(Ret)を測定した。

[0058] 実験には以下の各群を用いた(各群8匹)。

C群:コントロール

E群:EPOの一回あたり投与量40、400 または 4,000 U/kg体重

AE群:同量のアシアロEPO

(結果)

各投与によるSp:脾臓重量、Hb:ヘモグロビン濃度、Hct:ヘマトクリット値、Ret:網赤血球比率に及ぼす効果を図5に示す。結果をまとめると以下の通りである。

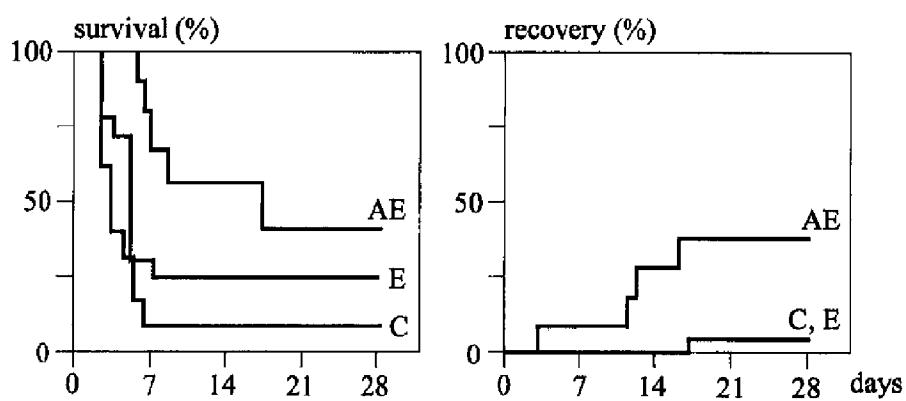
(1) EPOの投与によって、赤芽球造血の亢進(Ret)、脾臓での髄外造血の亢進(Sp)および多血症(Hb、Hct)が観察された。

(2) アシアロEPOの投与によっては、このような副作用が観察されなかった。

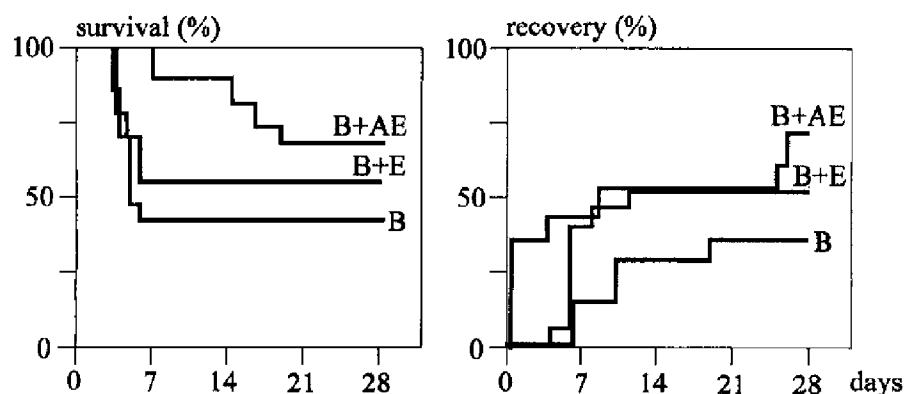
請求の範囲

- [1] エリスロポエチン(EPO)誘導体を有効成分とする虚血性疾患治療剤。
- [2] EPO誘導体がシアロEPOである請求項1に記載の治療剤。
- [3] 幹細胞含有物質とともに投与される請求項1または2いずれかに記載の治療剤。
- [4] 幹細胞含有物質が骨髄細胞である請求項3記載の治療剤。
- [5] EPO誘導体を有効成分とする血管促進剤。
- [6] EPO誘導体がシアロEPOである請求項5に記載の促進剤。
- [7] 幹細胞含有物質とともに投与される請求項5または6いずれかに記載の促進剤。
- [8] 幹細胞含有物質が骨髄細胞である請求項7記載の促進剤。
- [9] EPO誘導体を有効成分とする血流増加剤。
- [10] EPO誘導体がシアロEPOである請求項9に記載の増加剤。
- [11] 幹細胞含有物質とともに投与される請求項9または10いずれかに記載の増加剤。
- [12] 幹細胞含有物質が骨髄細胞である請求項11記載の増加剤。

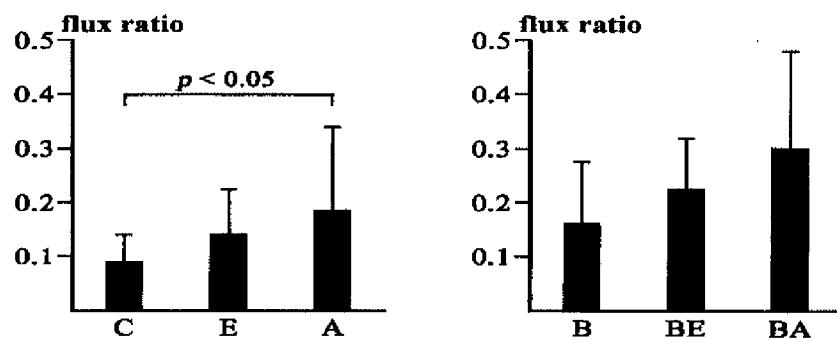
[図1]



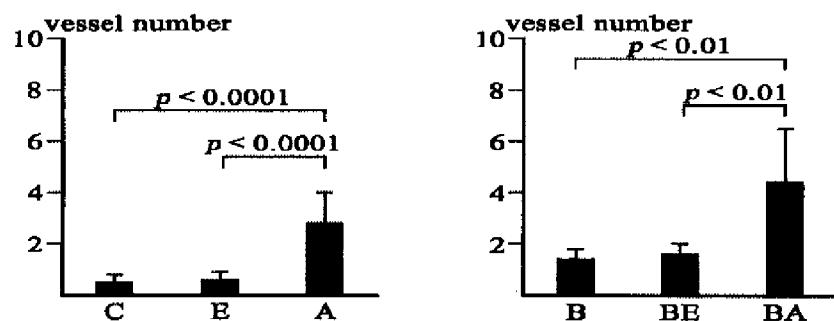
[図2]



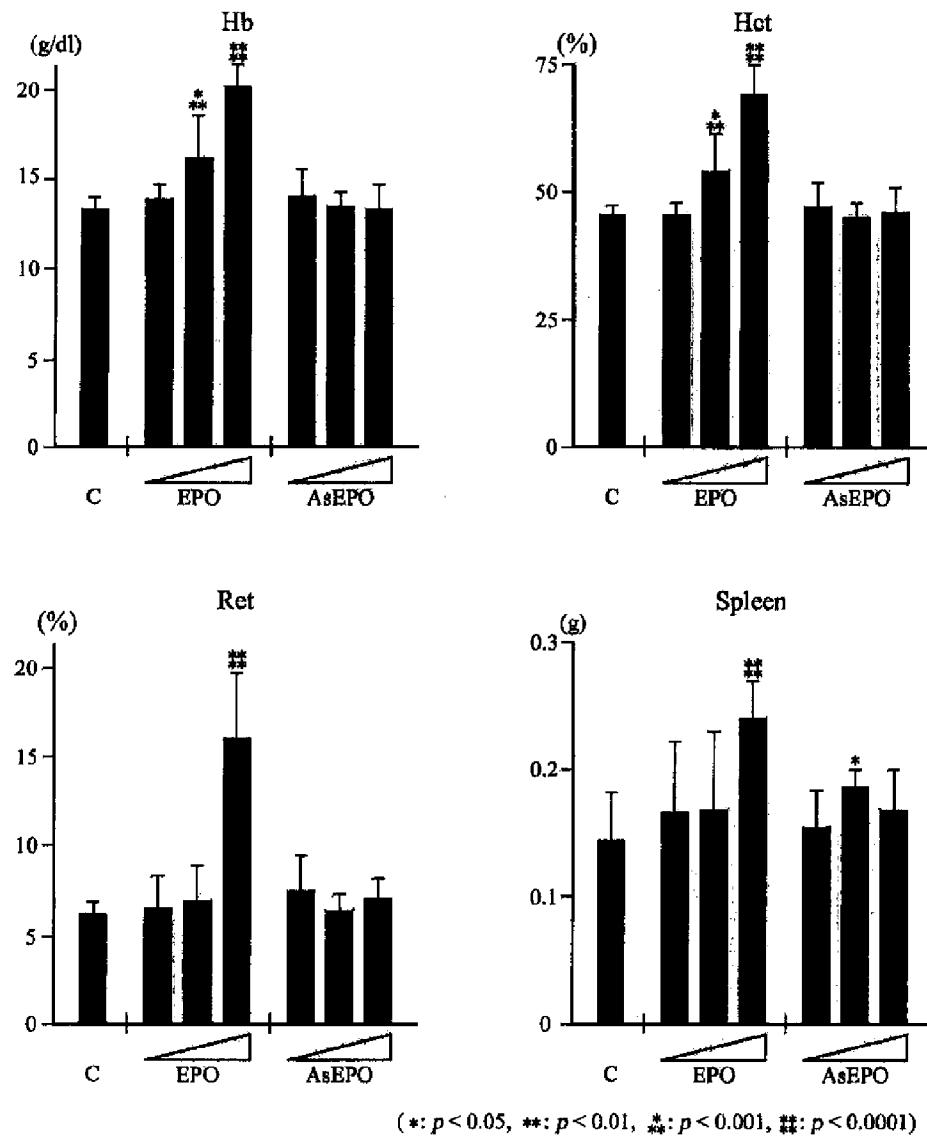
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2006/310989
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/22(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K35/28(2006.01)i, A61P9/10 (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/22(2006.01), A61K35/12(2006.01), A61K35/28(2006.01), A61P9/10 (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-507426 A (CRUCELL HOLLAND B.V.), 17 March, 2005 (17.03.05), Claims 24, 25; Par. No. [0053]; example 17; Fig. 7 & WO 2003/038100 A1 & EP 1440157 A1 & US 2005/164917 A1 & US 2005/181359 A1 & US 2006/099685 A1	1, 2
Y		3, 4
A		5-12
X	WO 2004/003176 A2 (The Kenneth S., Warren Institute, INC.), 08 January, 2004 (08.01.04), Page 102 [6.4.1.], Fig. 9; page 116 [6.12.2.], Fig. 23 & US 2004/122216 A1 & EP 1552298 A2 & JP 2006-507228 A	1, 2
Y		3, 4
A		5-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 August, 2006 (09.08.06)

Date of mailing of the international search report
22 August, 2006 (22.08.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2006/310989
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ERBAYRAKTAR S., Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity <i>in vivo</i> , Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, Vol.100, No.11, pages 6741 to 6746	1,2
Y		3,4
A		5-12
X	WANG X., The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin, Journal of neurochemistry, 2004, Vol.91, No.4, pages 900 to 910	1,2
Y		3,4
A		5-12
X	FIORDALISO F., A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, Vol.102, No.6, pages 2046 to 2051	1,2
Y		3,4
A		5-12
Y	Hiroaki MATSUBARA, "2. Saibo Ishoku ni yoru Kekkan Saisei Iryo - Masshosei Kekkanbyo kara Shinzobyo made", Experimental Medicine, Kabushiki Kaisha Yodosha, 2004, Vol.22, No.8 (special extra issue), pages 160 to 165	3,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2006/310989
--

<Concerning the subject to be searched>

The "EPO derivative" of claims 1, 3-5, 7-9, 11 and 12 includes various derivatives.

However, what is disclosed within the meaning of PCT Article 5 is only an "asialo-EPO" among the EPO derivatives, therefore, it is not sufficiently supported within the meaning of PCT Article 6.

Accordingly, a search was made on a part which is disclosed and supported in the description, that is, the asialo-EPO, and a carbamyl-EPO described as the EPO derivative though it is not supported in the description.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K38/22(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61K35/28(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K38/22(2006.01), A61K35/12(2006.01), A61K35/28(2006.01), A61P9/10(2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BTOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2005-507426 A (CRUCELL HOLLAND BV) 2005.03.17,	1, 2
Y	請求項 24, 25, 【0053】、実施例 17&図 7	3, 4
A	& WO 2003/038100 A1 & EP 1440157 A1 & US 2005/164917 A1 & US 2005/181359 A1 & US 2006/099685 A1	5-12
X	WO 2004/003176 A2 (The Kenneth S, Warren Institute, INC.)	1, 2
Y	2004.01.08,	3, 4
A	第 102 頁[6.4.1.]&Fig. 9、第 116 頁[6.12.2.]&Fig. 23 & US 2004/122216 A1 & EP 1552298 A2 & JP 2006-507228 A	5-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- E」国際出願前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.08.2006

国際調査報告の発送日

22.08.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

4P 3436

今村 玲英子

電話番号 03 3581 1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ERBAYRAKTAR S., Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity <i>in vivo</i> ,	1, 2
Y		3, 4
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, Vol. 100, No. 11, p. 6741-6746	5-12
X	WANG X., The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects	1, 2
Y	against neonatal hypoxia-ischemia as potently as	3, 4
A	erythropoietin, Journal of neurochemistry, 2004, Vol. 91, No. 4, p. 900-910	5-12
X	FIORDALISO F., A nonerythropoietic derivative of erythropoietin	1, 2
Y	protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury,	3, 4
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, Vol. 102, No. 6, p. 2046-2051	5-12
Y	松原弘明, 2. 細胞移植による血管再生医療－末梢生血管病から心臓病まで, 実験医学, 株式会社 羊土社, 2004, Vol. 22, No. 8(増刊), p. 160-165	3, 4

<調査の対象について>

請求の範囲 1,3-5,7-9,11,12 の「EPO誘導体」は、様々な誘導体を包含している。しかしながら、PCT第5条の意味において開示されているのは、EPO誘導体のうち「アシアロEPO」のみであり、PCT第6条の意味で十分に裏付けられていない。よって、調査は、明細書に開示され裏付けられている部分、すなわちアシアロEPOについて、及び、明細書において裏付けられてはいないがEPO誘導体として記載されるカルバミル化EPOについて行った。